



UnB – Universidade de Brasília
IQ – Instituto de Química

Matheus Erthal Silva

**AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO DO PEPTÍDEO Hs02
COM LIPOPOLISSACARÍDEOS DE *E. COLI* POR
DIFRAÇÃO DE LUZ E DICROÍSMO CIRCULAR**

Trabalho de Conclusão de Curso

Brasília – DF
2019

Matheus Erthal Silva

**AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO DO PEPTÍDEO Hs02
COM LIPOPOLISSACARÍDEOS DE *E. COLI* POR
DIFRAÇÃO DE LUZ E DICROÍSMO CIRCULAR**

Trabalho de conclusão de curso em Química Tecnológica apresentado ao Instituto de Química da Universidade de Brasília, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Química Tecnológica.

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Dotto Brand

Brasília – DF

2019

Agradecimentos

Gostaria de agradecer primeiramente a toda minha família. Graças as condições proporcionadas pelos meus pais, tive a oportunidade de poder entrar em uma Universidade Federal e desfrutar de todas as coisas boas que ela oferece. Sem o apoio deles também seria praticamente impossível chegar até onde eu cheguei. Agradecer também a minha namorada, Giulia, que está comigo desde o meu primeiro semestre e me deu apoio incondicional durante toda essa trajetória.

Um agradecimento especial aos meus colegas de curso que viraram verdadeiros amigos para a vida toda, assim espero. Só eles sabem de todas as situações difíceis que passamos juntos e de todos os momentos de alegria que pudemos desfrutar nesses longos 5 anos. Estevan, Giorgiane, Carol, Isabela, Saulo e Luiz, muito obrigado por tudo. Essa jornada sem vocês teria indiscutivelmente mais difícil.

Ao professor Guilherme por me dar o privilégio de ser orientado por ele nessa última etapa da minha graduação. Um professor e pesquisador de qualidade incontestável, sinto-me honrado em poder fechar a minha graduação dessa forma. Agradeço principalmente pela paciência e pelo tempo dedicados a me ajudar com as minhas dificuldades, sempre em prontidão e com muita boa vontade, propiciando um ambiente de muita harmonia. Isso faz toda a diferença na orientação de um aluno e na construção de um trabalho.

Não poderia deixar de fora também sua aluna de doutorado Michele. Sua ajuda nos momentos operacionais de obtenção de dados foram de extrema importância, além de sua companhia com boas conversas em nossas análises que eram demoradas. A prontidão e boa vontade em ajudar também sempre ficaram bem evidentes.

Gostaria de agradecer também o professor Carlos Bloch, que apesar de eu não ter conhecido, me deu a oportunidade de utilizar o equipamento de CD de seu laboratório na Embrapa. Também agradecer o seu aluno José Cardozo, mais conhecido como Zé, que fez me sentir super a vontade no laboratório, como se eu estivesse em casa. Me ajudou com a análise de dados de CD, me fazendo olhar os resultados por outras perspectivas. Além também das nossas conversas filosóficas sobre a vida e seus caminhos.

À professora Sônia Freitas, que também teve papel importante na construção desse trabalho, gostaria de agradecer pela oportunidade de fazer uso das dependências de seu laboratório. Ao professor Aizel e sua aluna Izadora que foram cruciais para a obtenção de dados do DLS. Mesmo o professor Aizel estando em fase de provas de concursos disponibilizou seu tempo para nos ensinar a mexer no equipamento e analisar os dados. E sua aluna Izadora que sempre se prontificou a ajudar enquanto o professor Aizel esteve ausente.

Aos integrantes do LITMO e LAQMOS em geral, que sempre abriam a porta do laboratório para mim e proporcionaram boas conversas ao longo desse último semestre.

RESUMO

Os peptídeos intragênicos antimicrobianos (IAPs) têm se apresentado como alternativas promissoras no combate a microrganismos patogênicos. Os IAPs são obtidos a partir de segmentos internos de proteínas de diversos organismos mediante busca utilizando parâmetros físico-químicos de peptídeos antimicrobianos (AMPs) já descritos na literatura. Um IAP denominado de Hs02, encontrado em uma proteína de *Homo sapiens*, apresentou atividade antimicrobiana e anti-inflamatória potente, inclusive em concentrações nanomolares. Para avaliar melhor sua atividade anti-inflamatória, no atual trabalho, o Hs02 foi submetido a análises de Dicroísmo Circular (CD) e Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS), a fim de verificar alterações estruturais provenientes da interação direta com lipopolissacarídeos (LPSs), endotoxinas responsáveis por atividade pró-inflamatória. Foi constatado que o Hs02, o qual se apresenta desestruturado em tampão, transita de conformação para um padrão compatível com α -hélice em uma relação dose dependente de LPS. Notou-se também uma mudança no estado de agregação dos LPSs proveniente da interação direta entre o Hs02 e a endotoxina, também apresentando relação dose-resposta. Tais resultados indicam que a atividade anti-inflamatória do IAP Hs02 pode ser devido a uma interação direta entre peptídeo e o LPS e abrem porta para novas investigações acerca dos pré-requisitos estruturais da interação entre peptídeos e lipopolissacarídeos em geral.

Palavras-chave: Peptídeos Antimicrobianos; Lipopolissacarídeos; AMPs; LPSs; Peptídeos Antimicrobianos Intragênicos; IAPs

ABSTRACT

The intragenic antimicrobials peptides (IAPs) has been presenting as a promising alternative against pathogenic microorganisms. The IAPs are obtain from internal protein segments of several organisms through searching utilizing physicochemical parameters from antimicrobial peptides (AMPs) that were already published. An IAP named Hs02, found in a *Homo sapiens* protein, presented powerful antimicrobial and anti-inflammatory activity, even in nanomolar concentration. In order to evaluate better its anti-inflammatory activity, in the actual work, the Hs02 were submit to the analysis of Circular Dicroism (CD) and Dynamic Light Scattering (DLS), in order to verify structural changes from direct interaction with lipopolysaccharides (LPSs), endotoxins responsible for pro-inflammatory activity. It was find that the Hs02, which does not presents regular structure in buffer, shows a transition into a structure compatible with α -helix in a LPS-dependent dose ratio. There was also a change in the state of aggregation of LPSs resulting from the direct interaction between Hs02 and endotoxin, also presenting dose-response relationship. These results indicates that the anti-inflammatory activity of the IAP Hs02 may be due a direct interaction between the peptide and the LPS, which open doors about new investigations of structural prerequisites of interaction between peptides and LPSs.

Key-words: Antimicrobial Peptides; Lipopolysaccharides; AMPs; LPSs; Intragenic Antimicrobial Peptides; IAPs

LISTA DAS PRINCIPAIS ABREVIações

AMP – Peptídeo Antimicrobiano

LPS – Lipopolissacarídeo

CD – Espectroscopia de Dicroísmo Circular

DLS – Espalhamento Dinâmico de Luz

IAP – Peptídeo Antimicrobiano Intragênico

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral Alfa

LBP – Proteína de Ligação ao Lipopolissacarídeo

PBS – Phosphate Buffered Saline

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 – Equação de transformação de elipticidade (deg) em elipticidade molar residual ($\text{deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$).	9
Equação 2 – Equação para determinação de porcentagem de hélice relativa.	9
Equação 3 – Equação da Lei de Lambert-Beer.	11

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Exemplos de estrutura secundária de peptídeos, sendo (a) uma estrutura em α -hélice, (b) estrutura em folha- β , (c) estrutura em loop e (d) estrutura estendida.	3
FIGURA 2 – Estrutura da parede celular de uma bactéria gram-negativa.	5
FIGURA 3 – Esquema de representação da estrutura de um LPS.	5
FIGURA 4 – Esquema simplificado do mecanismo de ação de AMPs na inibição da atividade celular pró-inflamatória decorrente da presença de LPS.	6
FIGURA 5 – Espectro CD para diferentes estruturas secundária de proteínas.	9
FIGURA 6 – Representação esquemática da instrumentação de um DLS. L é radiação incidida, S é a amostra, PD é o detector e COR é o sinal.	10
FIGURA 7 - Espectro da região de UV distante (260 a 200nm) para o peptídeo Hs02 puro a uma concentração de 20 μ M em tampão PBS.	13
FIGURA 8 – Espectro da região UV distante (200 a 260 nm) para o peptídeo Hs02 puro (em verde) e amostras de Hs02 acrescidos de LPS nas razões de 0,089 e 0,178 mol/mol de LPS/Hs02.	14
FIGURA 9 – Espectro da região UV distante (200 a 260 nm) para o peptídeo Hs02 puro (em verde) e amostras de Hs02 acrescidos de LPS nas razões de 0,267; 0,356 e 0,445 mol/mol de LPS/Hs02.	15
FIGURA 10 – Porcentagem de Hélice do Hs02 em função das diferentes razões mol/mol de LPS/Hs02.	16
FIGURA 11 – Raio Hidrodinâmico do agregado de maior tamanho para cada razão mol/mol de LPS/Hs02.	17

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Concentração de Hs02 e LPS em cada amostra e sua respectiva razão molar.	12
Tabela 2 – Concentração de Hs02 e LPS em cada amostra e sua respectiva razão molar.	12
Tabela 3 – Valores de porcentagem de hélice obtidos para cada relação mol/mol de LPS/Hs02.....	15

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	2
2.1 Geral	2
2.2 Específico	2
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
3.1 Peptídeos Antimicrobianos	3
3.2 Estrutura da Membrana Externa de Bactérias Gram-Negativas: os lipopolissacarídeos	4
3.3 Atividade Anti-Inflamatória de AMPs: a conexão com LPSs	6
3.4 Peptídeos Antimicrobianos Intragênicos e o Peptídeo Hs02	7
3.5 Técnicas Biofísicas para Análise de Interação Molecular	8
3.5.1 Espectroscopia de Dicroísmo Circular	8
3.5.2 Espalhamento Dinâmico de Luz	9
4. METODOLOGIA	11
4.1 O peptídeo Hs02 e os Lipopolissacarídeos	11
4.2 Quantificação do Peptídeo	11
4.3 Espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD)	11
4.4 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)	12
5. RESULTADOS & DISCUSSÃO	13
5.1 Quantificação do Peptídeo	13
5.2 Hs02 estrutura em α -hélice a partir de interação com o LPS	13
5.3 Hs02 diminui o tamanho dos agregados de LPS em altas relações molares de LPS/Hs02	16
6. CONCLUSÃO & PERSPECTIVAS	19
7. BIBLIOGRAFIA	20

1. INTRODUÇÃO

O surgimento de superbactérias resistentes aos métodos convencionais de tratamento, como o uso de antibióticos, já é uma realidade.¹ Com isso, está ficando cada vez mais difícil tratar infecções bacterianas, que podem acabar levando a sepse. No Brasil, a sepse tem uma taxa de mortalidade de cerca de 30% e cerca de 30% dos leitos em UTIs são ocupados por pessoas com essa doença.²

A sepse é a inflamação generalizada em todo o corpo decorrente de um processo infeccioso. Essa resposta do sistema imune pode ocasionar o mau funcionamento, e até a morte, dos órgãos.³ Assim, torna-se importante tratar a infecção e os causadores dos processos pró-inflamatórios.

Dessa forma, os peptídeos antimicrobianos (sigla em inglês: AMPs) surgem como uma boa alternativa para lidar com esses problemas. As características físico-químicas dessas moléculas permitem que ocorra uma interação direta com a membrana celular dos microrganismos patogênicos, desencadeando sua lise e consequentemente morte celular. Esse comportamento específico dos AMPs resulta em menor frequência do surgimento de microrganismos resistentes a partir de mutações genéticas, diferentemente dos métodos convencionais.⁴

Além de suas atividades já conhecidas, os AMPs têm se mostrado potenciais combatentes de atividades pró-inflamatórias causadas por lipopolissacarídeos (LPSs).⁵ Os LPSs são constituintes da membrana celular externa de bactérias Gram-negativas e são as endotoxinas responsáveis por causar os sintomas típicos de uma infecção bacteriana, como febre, dor e vômitos. São também moléculas capazes de ativar vias sinalizadores celulares que liberam citocinas pró-inflamatórias.⁶

A adição de AMPs a células previamente submetidas a LPSs resulta, tipicamente, na inibição da capacidade das endotoxinas em ativar as vias sinalizadoras, e consequentemente na inibição da liberação de citocinas pró-inflamatórias. Esse comportamento tem se mostrado decorrente da interação direta entre os peptídeos e os LPSs, podendo ser evidenciado a partir de mudanças estruturais nessas moléculas. Os efeitos dessas interações nos AMPs têm sido analisados por alterações na estrutura secundária dos peptídeos. Já nos LPSs é evidenciado por uma mudança no estado de agregação da endotoxina.

Sendo assim, duas técnicas biofísicas de interação molecular têm sido amplamente utilizadas. A Espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD) é empregada para investigar a estrutura secundária de proteínas e o Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) é comumente aplicado para designar o estado de agregação de LPSs.

Segmentos proteicos obtidos a partir de proteínas de seres humanos, conhecidos como Peptídeos Intragênicos Antimicrobianos (IAPs), mostraram-se eficientes em executar as mesmas tarefas que os AMPs, inclusive a de agir como moléculas anti-inflamatórias. O peptídeo Hs02 teve um grande destaque nesse grupo, apresentando características que viabilizam a sua utilização. Contudo, ainda é necessário avaliar se a sua atividade anti-inflamatória é proveniente da interação com LPSs,⁷ assim como acontece com os AMPs em geral.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar se ocorre interação entre o peptídeo intragênico antimicrobiano Hs02 com LPS proveniente da parede celular de *E. coli* utilizando técnicas biofísicas de interação molecular.

2.2 Específicos

Caracterizar por Espectroscopia de Dicroísmo Circular a estrutura do peptídeo Hs02 na presença de concentrações crescentes de LPS.

Avaliar por Espalhamento Dinâmico de Luz possíveis efeitos do peptídeo Hs02 no tamanho dos agregados de LPS.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Peptídeos Antimicrobianos

Os peptídeos antimicrobianos (AMPs) compõem um grupo de moléculas com significativa diversidade estrutural e têm se mostrado promissores no combate a microrganismos patogênicos como vírus, fungos e bactérias. O primeiro relato de moléculas desse grupo foi no ano de 1939^{8,9} e desde então mais de 5.000 diferentes tipos de AMPs foram publicados na literatura.¹⁰

Esses peptídeos podem ser encontrados em todos os reinos de seres vivos, desde bactérias e fungos, passando por plantas até chegar em animais.^{11,12} Dessa forma apresentam uma variedade de mecanismos de ação e estruturas. Sendo assim, uma das maneiras encontradas de categorizar essas moléculas foi a partir de sua estrutura secundária.¹³ As quais são: α -hélice, folha β , estrutura estendida e estrutura em loop¹⁴. Representações dessas estruturas estão presentes na Figura 1.

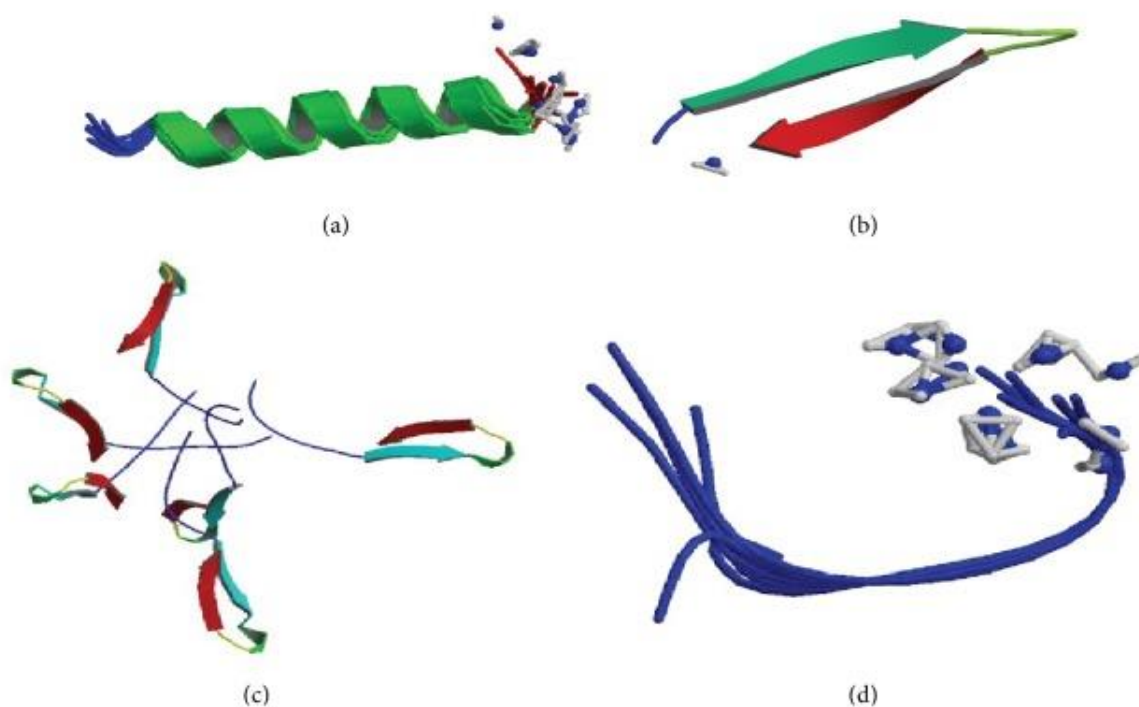


FIGURA 1 – Exemplos de estrutura secundária de peptídeos, sendo (a) uma estrutura em α -hélice, (b) estrutura em folha- β , (c) estrutura em loop e (d) estrutura estendida.⁴

A maioria dos AMPs pertencem à categoria das estruturas em α -hélice e folha β ,¹⁷ onde os AMPs estruturados em α -hélice são os mais estudados. Porém, ainda existem AMPs que não se encaixam em nenhuma dessas categorias¹⁸ e AMPs que possuem em sua cadeia polipeptídica duas dessas estruturas.¹⁹ Ademais, encontram-se moléculas que somente apresentam estrutura a partir da interação com membranas celulares.

Apesar de toda essa diversidade, existem algumas características em comum entre os AMPs. Tais características estão relacionadas com a estrutura primária e

secundária do peptídeo e se configuram como fatores importantes para definir qual o mecanismo de ação, seus alvos moleculares e nível de atividade do AMP. Porém pouco se sabe sobre a relação estrutura-função, tornando-se complicado prever o comportamento dessas moléculas. Todavia existem alguns pontos imprescindíveis que devem ser analisados quando se estuda um AMP, como por exemplo o tamanho da cadeia polipeptídica, a carga elétrica da estrutura, a anfifilicidade e a porcentagem de hélice.¹⁴

Com relação a esses atributos, a maioria dos AMPs apresenta uma carga elétrica positiva, sendo também chamados de peptídeos catiônicos, e são anfifílicos (contendo uma parte hidrofóbica e uma hidrofílica), assim possibilitando uma interação tanto com moléculas polares quanto com apolares. A anfifilicidade está relacionada a outra característica dos AMPs: hidrofobicidade. Acredita-se ser necessário que um AMP tenha pelo menos 50% dos resíduos de aminoácidos hidrofóbicos (como Alanina, Valina e Leucina), garantindo assim uma boa interação com membranas celulares.^{20,21}

Todas essas características conferem aos AMPs diferentes mecanismos de ação contra microrganismos patogênicos, os quais estão mais relacionados a uma interação direta com as membranas celulares. Assim, eles diferem dos antibióticos convencionais, os quais alteram atividades celulares (respiração celular, síntese proteica, entre outros). Com isso fica mais difícil das bactérias adquirirem mutações genéticas capazes de anular o efeito dos AMPs, como acontece com os antibióticos convencionais.

Para que a interação entre os AMPs e as membranas de procariotos leve à lise celular é necessário, primeiramente, que a hidrofobicidade do AMP esteja próxima a um limiar, como já citado em parágrafos anteriores. Pois é essa característica que vai determinar o grau de interação com a bicamada lipídica da membrana celular. Um AMP com uma hidrofobicidade muito elevada pode se tornar tóxico, visto que a cadeia polipeptídica pode acabar interagindo também com membranas de células eucarióticas e acabar causando morte celular.²²

Outro fator de grande importância é a carga do AMP. O primeiro contato com a membrana celular de bactérias é estabelecido por uma interação eletrostática entre íons de carga oposta. Uma vez que as membranas celulares possuem uma carga geral negativa (bactérias gram-negativas, por exemplo), é necessário que os AMPs possuam uma carga elétrica positiva. Pesquisadores, ainda, já conseguiram associar um aumento da carga elétrica do AMP com um aumento de sua capacidade antimicrobiana, podendo ser essa relação, entretanto, linear, não linear, direta ou inversamente proporcional.²³

Dessa forma, os AMPs se mostram muito promissores, pois essas características determinantes em sua atividade antimicrobiana podem ser modificadas a partir de sínteses laboratoriais, aumentando a potencialidade de suas ações, diminuindo sua toxicidade ou formar híbridos mais resistentes ou que tenham algum

alvo específico. Tudo isso graças ao fato deles serem compostos por resíduos de aminoácidos que podem ser substituídos por outros de acordo com o objetivo.²⁴

3.2 Estrutura da Membrana Externa de Bactérias Gram-Negativas: os lipopolissacarídeos

As bactérias podem ser divididas basicamente em dois grandes grupos: bactérias gram-negativas e bactérias gram-positivas. A principal diferença entre elas reside na estrutura de sua membrana externa (ou parede celular, como chamam alguns autores). De forma simplificada, a parede celular de bactérias gram-positivas é basicamente composta por ácido teicóico e uma camada bem espessa de peptideoglicano, enquanto que a parede celular de bactérias gram-negativas é composta por lipopolissacarídeos (LPSs) e uma camada mais fina de peptideoglicano, como mostra a Figura 2 abaixo.

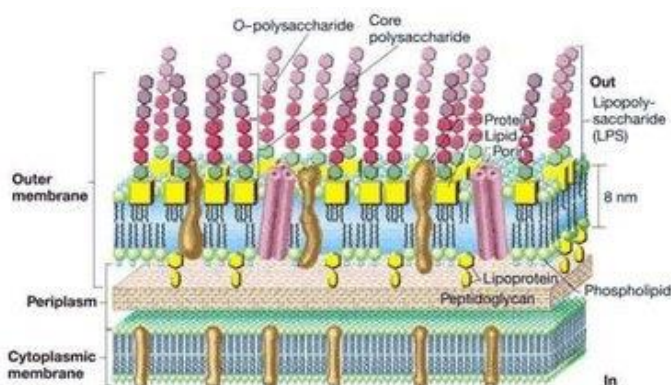


FIGURA 2 – Estrutura da parede celular de uma bactéria gram-negativa.²⁵

Os LPSs, presentes na membrana externa de bactérias gram-negativas (Figura 2), são endotoxinas que ao serem liberadas na corrente sanguínea causam os sintomas característicos de uma infecção bacteriana, como febre, vômitos, dores, entre outros. A liberação dessa molécula ocorre quando há morte ou multiplicação celular da bactéria.²⁶

A estrutura de um LPS é composta por um lipídeo A, um polissacarídeo cerne e um polissacarídeo O, como pode-se observar na Figura 3. Em um LPS, o lipídeo A é a endotoxina responsável pelos sintomas. O polissacarídeo O é a parte mais externa da porção sacarídica e o polissacarídeo cerne é a parte mais interior da porção sacarídica.²⁶

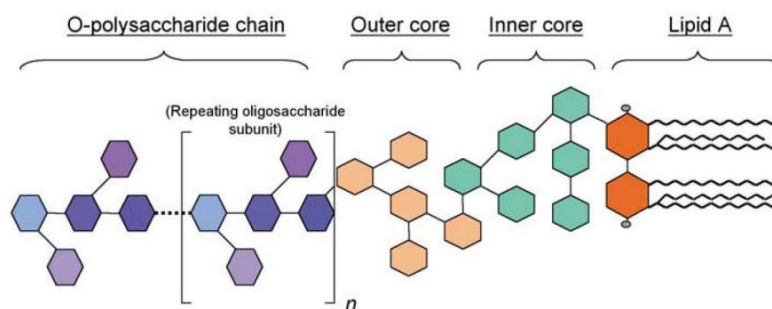


FIGURA 3 – Esquema adaptado de representação da estrutura de um LPS.²⁷

O lipídeo A é a parte hidrofóbica do LPS e que fica ancorada na membrana externa. É composta geralmente por glicosamina e cadeias de ácidos graxos. A porção hidrofílica do LPS é composta pela parte sacarídica, sendo o polissacarídeo-O composto por até 40 unidades de até 7 açúcares diferentes. Já o polissacarídeo cerne é a conexão das duas partes, composto por açúcares peculiares e varia de bactéria para bactéria.²⁸

3.3 Atividade anti-inflamatória de AMPs: a conexão com LPSs

Além de ser responsável pelos sintomas de uma infecção bacteriana, os LPSs são moléculas sinalizadores, ou seja, a sua presença ativa uma série de mecanismos das células que acabam por produzir uma resposta imune.²⁹ Uma das respostas (das várias vias de sinalização existentes) do sistema imune é a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como por exemplo o Fator de Necrose Tumoral α (sigla em inglês: TNF- α).³⁰

Sendo assim, investigar maneiras de inibir o mecanismo de ação de LPSs, ou seja, desativá-los de alguma forma, se tornou uma importante área de estudo com o fim de prover potenciais fármacos capazes de inibir processos pró-inflamatórios. Estudos revelam^{7,31} que os AMPs possuem capacidade de exercer tal função, abrindo ainda mais o leque de funcionalidades desses peptídeos.

Nan et al. (2012) fizeram uma série de análises em diversos AMPs derivados da catelidicina humana LL-37. Em uma delas, avaliou a concentração de TNF- α em macrófagos de camundongos estimuladas por LPS e posteriormente tratadas com os peptídeos. Foi constatado que todos os derivados, na concentração de 5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, inibiram significativamente a liberação de TNF- α nessas células.⁵

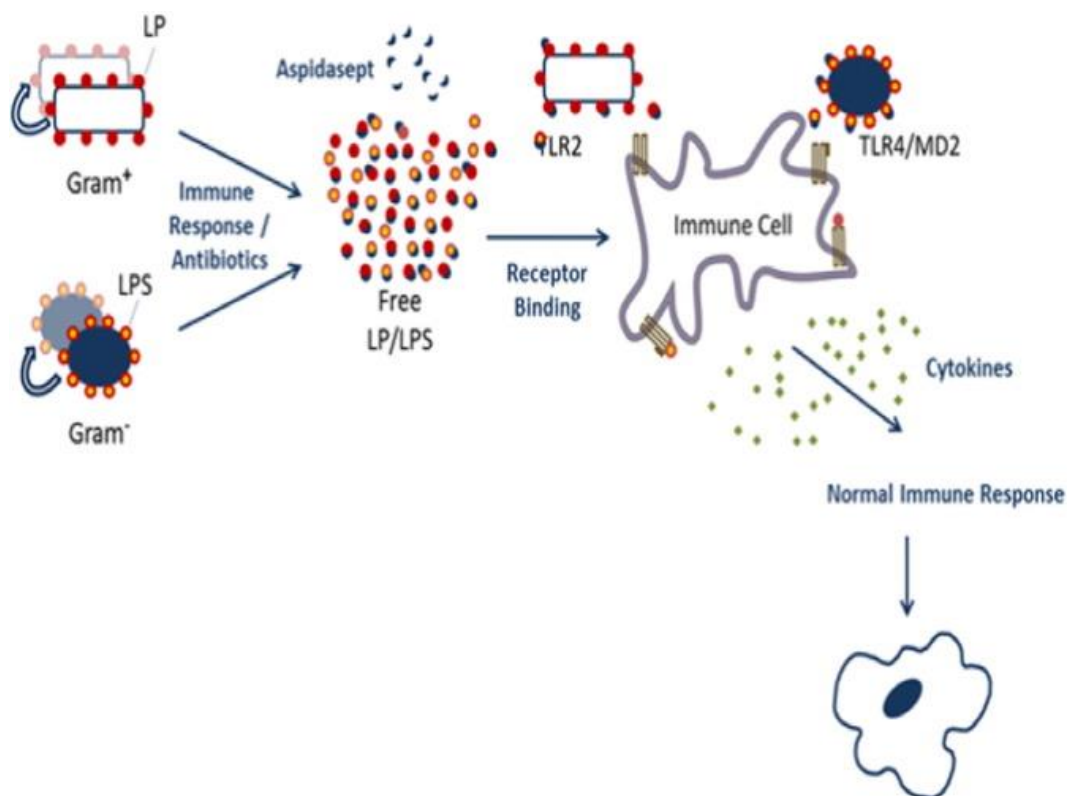


FIGURA 4 – Esquema simplificado do mecanismo de ação de AMPs na inibição da atividade celular pró-inflamatória decorrente da presença de LPS.³²

O principal acontecimento responsável por dar início à atividade pró-inflamatória dos LPSs é a ligação da endotoxina à proteína de ligação ao lipopolissacarídeo (LBP). Como pode-se observar pelo esquema da Figura 4, a morte celular de bactérias gram-negativas libera os LPSs e, hipoteticamente, na presença de AMPs, a formação do complexo LPS-LBP é prejudicada. Podendo acontecer por uma ligação entre LPS e AMP, impedindo a ligação entre LPS e LBP ou o AMP competindo pela LBP junto ao LPS.⁴

Para responder essas perguntas, é necessário analisar o comportamento dos AMPs na presença de LPSs pela avaliação de mudanças estruturais do peptídeo ou a diminuição do tamanho dos agregados do LPS, por exemplo. Com esse objetivo, Li et al. (2004) revelou em um estudo a ligação do AMP Sushi3 (S3) ao LPS,³³ resultado promissor e condizente, já que a carga e hidrofobicidade dos AMPs permitem que essa interação ocorra.⁴

Seguindo a mesma linha de estudo, Ryder et al. (2014) analisaram a estruturação de um AMP na presença de LPS, a partir da Espectroscopia de Dicroísmo Circular. Em solução aquosa o peptídeo WLBU2 não apresentava estrutura definida, entretanto, na presença de LPS chegou a alcançar 78% de α -hélice. Ainda nesse estudo, o AMP se mostrou capaz de aumentar o tamanho dos agregados de LPS, avaliação realizada por meio da análise de Espalhamento Dinâmico de Luz.³⁴

Como mostram esses estudos, a hipótese de que a atividade anti-inflamatória dos AMPs é proveniente de sua interação direta com as endotoxinas de bactérias gram-negativas se torna muito consistente. Dessa forma, as técnicas biofísicas de

interação molecular, como dicroísmo circular e espalhamento dinâmico de luz, assumem um papel crucial na busca por evidências de interação.

3.4 Peptídeos Antimicrobianos Intragênicos e o Peptídeo Hs02

A diversidade de AMPs já encontrados e estudados é enorme, porém, como já relatado, eles possuem algumas características físico-químicas em comum que auxiliam na descoberta de mais moléculas desse tipo. Graças a isso foi possível encontrar segmentos proteicos com parâmetros físico-químicos similares ao de AMPs dentro de proteínas humanas. Tais sequências receberam o nome de peptídeos antimicrobianos intragênicos (IAPs).

As proteínas são biomoléculas compostas por várias cadeias polipeptídicas, se tornando então uma fonte de moléculas biologicamente ativas. Com o desenvolvimento de uma ferramenta bioinformática chamada Kamal, foi possível realizar uma espécie de pesquisa de cadeias polipeptídicas com determinadas características físico-químicas a partir de diversas proteínas.⁷

Brand et al. (2019) utilizaram esse software para encontrar possíveis candidatos a AMPs a partir de proteínas de *Homo sapiens*. Para tal usaram as características já descritas que configuram cadeias polipeptídicas como potenciais AMPs. Com as sequências de resíduos de aminoácidos encontradas, as mesmas foram sintetizadas quimicamente e submetidas a uma série de análises com o objetivo de constatar suas atividades biológicas.

Um dos destaques do trabalho foi o peptídeo nomeado Hs02, apresentando atividade antimicrobiana significativa nas análises realizadas. Em outra análise, agora de toxicidade a células humanas, o Hs02 também teve bons resultados se mostrando não tóxico. O Hs02 é originário da proteína não convencional miosina 1h e possui uma massa molar de 1961,23 g.mol⁻¹ e 16 resíduos de aminoácidos, sendo a sua estrutura primária dada por KWAVRIIRKFIKGFIS-NH₂. A sua estrutura secundária se mostrou indefinida em tampão PBS de pH 7,4 e concentração 20 µM.

Um dos resultados mais promissores deste trabalho foi o de inibição da liberação da citocina pró-inflamatória TNF-α em macrófagos murinos pré-estimulados com LPS, a qual ocorreu mesmo utilizando o peptídeo em concentrações nanomolares. Contudo, resta saber se o Hs02 apresenta algum mecanismo de ação anti-inflamatório intracelular ou se existem evidências de interação direta deste peptídeo com LPSs.

3.5 Técnicas Biofísicas para Análise de Interação Molecular

3.5.1 Espectroscopia de Dicroísmo Circular

A primeira técnica biofísica utilizada no trabalho atual foi a Espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD). Esta técnica consiste em medir a diferença de absorção da luz polarizada no sentido horário e da luz polarizada no sentido anti-horário pelas moléculas. Para que uma molécula absorva diferentemente a luz nessas condições é necessário que ela tenha um carbono quiral, já que pode assim apresentar mais de uma conformação.³⁵

O CD é muito utilizado para determinar a estrutura secundária de proteínas, já que os resíduos de aminoácidos que compõem uma cadeia peptídica possuem carbonos quirais. É sabido que essas cadeias podem adotar conformações distintas, como a α -hélice e a folha β , as quais vão acabar absorvendo a luz circularmente polarizada de forma diferencial. Sendo assim é possível determinar, por exemplo, qual é a porcentagem de hélice de um peptídeo a partir do espectro de CD na região do UV distante.³⁶

Tais características conferem a essa técnica várias aplicações que estão relacionadas a estrutura de proteínas. Uma aplicação de extrema importância para o atual trabalho é a interação de peptídeos com outras moléculas e uma comparação da estrutura antes e depois da interação pode evidenciar isso.

Em um espectro de CD é gerada uma curva que relaciona a diferença de absorção para cada comprimento de onda em função do comprimento de onda na região de absorção da ligação peptídica, sendo o gráfico expresso em elipticidade por comprimento de onda. Quando a cadeia peptídica assume a estrutura de α -hélice ou de folha β uma curva bem característica é gerada, conforme ilustração da Figura 5.³⁷

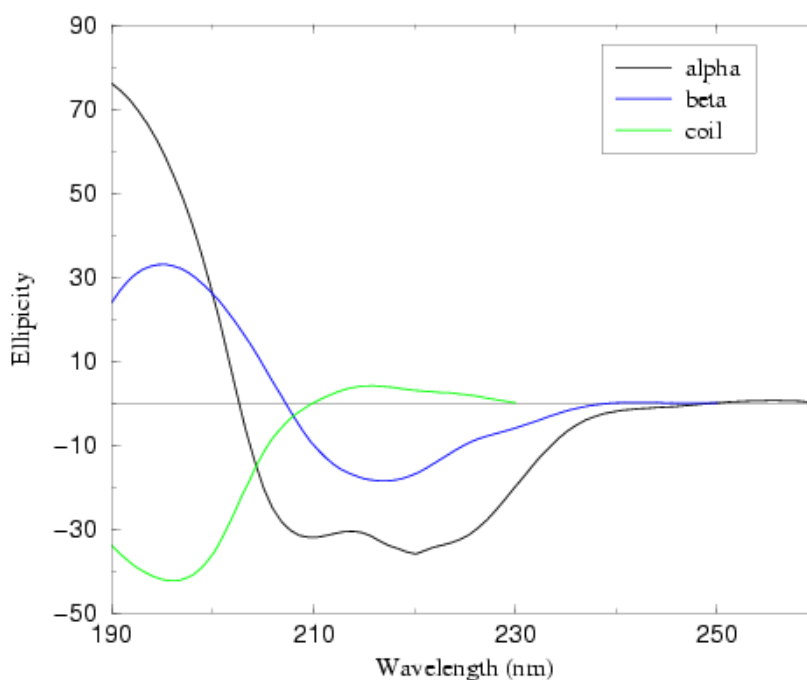


FIGURA 5 – Espectro CD para diferentes estruturas secundária de proteínas.³⁸

Pode-se observar que para a α -hélice são obtidos dois valores negativos de elipticidade nos comprimentos de 208 e 222 nm e um valor positivo no comprimento de onda de aproximadamente 190 nm. Já para a folha β tem-se um valor negativo entre os valores de 200 e 210 nm e um valor positivo entre 195 e 200 nm.³⁵

Para obter um resultado global e comparável na literatura, independente das condições e do equipamento utilizado, a elipticidade é transformada em elipticidade molar residual, principalmente quando trabalha-se com proteínas. A transformação é feita por meio da Equação 1.

$$[\theta] = \frac{\theta \times 100 \times M}{C \times l \times n} \text{ (Equação 1)}^{35}$$

Onde $[\theta]$ é a elipticidade molar residual em $\text{deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$, θ é a elipticidade em deg, l é o caminho óptico em cm, C é a concentração em mg.mL^{-1} , n é o número de resíduos e M a massa molar do peptídeo. A partir dos resultados também é possível calcular a porcentagem de hélice da cadeia polipeptídica em relação a uma hélice perfeita, utilizando a equação abaixo:

$$fH = ([\theta]_{222} - 3,000)/(-36,000 - 3,000) \text{ (Equação 2)}^{35}$$

Onde $[\theta]_{222}$ é elipticidade molar residual no comprimento de onda de 222 nm e fH é porcentagem de hélice.

3.5.2 Espalhamento Dinâmico de Luz

Para dar continuidade ao trabalho, utilizou-se o Espalhamento Dinâmico de Luz (do inglês, *Dynamic Light Scattering* – DLS). A técnica consiste em incidência de radiação eletromagnética, a qual será espalhada por macromoléculas contidas na amostra, sendo o raio espalhado identificado por um detector posicionado a um ângulo pré-determinado do raio incidente. A partir da diferença de intensidade de luz do raio incidente e do raio espalhado é possível determinar algumas características cruciais das moléculas responsáveis pelo espalhamento, como raio hidrodinâmico e peso molecular.⁴⁰

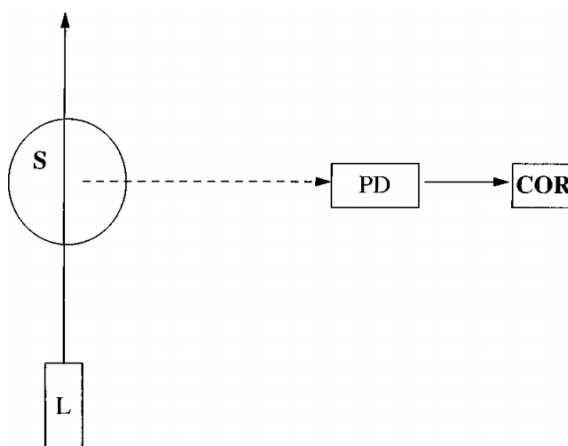


FIGURA 6 – Representação esquemática da instrumentação de um DLS. L é radiação incidida, S é a amostra, PD é o detector e COR é o sinal.³⁹

Como em solução as moléculas estão em constante movimento, as leituras são obtidas em relação ao tempo. Sendo necessárias várias corridas em uma leitura, que são determinadas pelo próprio equipamento baseado nas características da amostra. Além de serem feitas também mais de uma leitura, buscando sempre obter um resultado com a menor flutuação possível.³⁹

As vantagens de usar a técnica de espalhamento de luz estão relacionadas a facilidade em se alterar importantes variáveis, como temperatura, concentrações e tampões. Além disso, trata-se de uma técnica que requer amostras em baixas concentrações, além de ser não invasiva, apresentando resultados instantâneos. Tais

características conferem ao DLS uma série de aplicações, como por exemplo a investigação da interação entre proteínas e outras moléculas e a determinação do tamanho de agregados de LPSs.³⁹

Bergstrand et al. (2006) submeteram LPS de *E. coli* a várias análises a fim de determinar o tamanho dos agregados de LPS. Uma dessas análises foi feita por meio da técnica de DLS, onde os pesquisadores foram capazes de constatar dois agregados de tamanhos diferentes, por exemplo.⁴⁰

4. EXPERIMENTAL

4.1 O Peptídeo Hs02 e os Lipopolissacarídeos

O peptídeo Hs02 (KWAVRIIRKFIKGFIS-NH₂) foi obtido por síntese química em fase sólida e purificado por cromatografia líquida de alta eficiência utilizando coluna preparativa de fase reversa no Laboratório de Síntese e Análise de Biomoléculas (LSAB) do Instituto de Química da Universidade de Brasília (UnB) em trabalhos anteriores. O LPS é proveniente de fontes comercial, particularmente da bactéria *Escherichia coli* O55:B5, sendo comprado da empresa Sigma-Aldrich. A concentração do LPS é de difícil estimativa, já que se trata de molécula com tamanho variável da porção sacarídica. Para o atual trabalho, a concentração do LPS de *E. coli* O55:B5 foi estimada de acordo com cálculos prévios presentes na literatura.⁴¹

4.2 Quantificação do Hs02

A quantificação do peptídeo foi feita por meio da Espectroscopia de Absorção Molecular UV-VIS, utilizando o equipamento UV-1280 da SHIMADZU. Foi realizada a leitura de uma solução de peptídeo em uma cubeta com caminho óptico de 1 cm e em um comprimento de onda de 280 nm. O primeiro passo então foi preparar a solução estoque do peptídeo Hs02, onde foram dissolvidos 4,93 mg do peptídeo liofilizado em 500 µL de água deionizada. Posteriormente diluiu-se 20 µL da solução estoque em 980 µL de água deionizada e realizou-se a leitura. Para determinar a concentração utilizou-se a Lei de Lambert-Beer expressa abaixo.

$$A = \varepsilon \cdot b \cdot c \text{ (Equação 3)}$$

Onde ε é a absorvidade molar, b é o caminho óptico e c a concentração em mol·L⁻¹. O W tem melhor absorção no comprimento de onda de 280 nm⁴² e sua absorvidade molar é de 5500 L·mol⁻¹·cm⁻¹.⁴³

4.3 Espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD)

O experimento de dicroísmo circular foi feito no equipamento Jasco J-815 (Jasco International CO., Japão) no Laboratório de Espectrometria de Massa da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, onde as leituras foram realizadas na faixa de comprimento de onda de 200 a 260 nm, com um intervalo de 0,1 nm. Utilizou-se uma cubeta de quartzo com caminho óptico de 0,1 cm e tempo de resposta de 0,5s. Cada leitura da amostra consistia em 4 varreduras para obtenção do espectro final. Para o peptídeo foi utilizada uma concentração de 20 µM e para o LPS empregou-se cinco concentrações diferentes, de acordo com a Tabela abaixo. Todas as soluções foram preparadas utilizando o tampão PBS em pH 7,4, concentração 20 mM de fosfato e 150 mM do sal NaCl. Foram obtidas leituras para o Hs02 puro, para o LPS puro em suas diferentes concentrações e para o Hs02 acrescido de LPS nas diferentes proporções. Os espectros obtidos para Hs02 acrescidos de LPS foram corrigidos pelos respectivos espectros de LPS puro. O cálculo da molaridade do LPS foi feito utilizando dados publicados na literatura.

Tabela 1 – Concentração de Hs02 e LPS em cada amostra e sua respectiva razão molar.

Amostra	Concentração de Hs02 ($\mu\text{mol/L}$)	Concentração de LPS ($\mu\text{mol/L}$)	Razão LPS/Hs02 (mol/mol)
1	20	1,78	0,089
2	20	3,56	0,178
3	20	5,34	0,267
4	20	7,12	0,356
5	20	8,90	0,445

4.4 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

Para o experimento de DLS, utilizou-se o equipamento Zetasizer Nano ZS do Laboratório de Biofísica Molecular do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília, onde as leituras foram realizadas em uma cubeta de 1 cm e temperatura de 25 °C. As soluções foram todas preparadas em tampão PBS de pH 7,4, concentração de 20 mM de fosfato e 150 mM do sal NaCl. Primeiramente realizou-se a leitura apenas do LPS na concentração de 0,90 $\mu\text{mol/mL}$ e posteriormente foi-se adicionando o peptídeo Hs02 nas razões molares da tabela abaixo, mantendo a concentração de LPS constante. Todas as amostras foram submetidas a 5 leituras.

Tabela 2 – Concentração de Hs02 e LPS em cada amostra e sua respectiva razão molar.

Amostra	Concentração de Hs02 ($\mu\text{mol/L}$)	Concentração de LPS ($\mu\text{mol/L}$)	Razão LPS/Hs02 (mol/mol)
1	0,05	0,90	18
2	0,10	0,90	9
3	0,20	0,90	4,5
4	1,01	0,90	0,89
5	2,02	0,90	0,45
6	5,05	0,90	0,18
7	10,10	0,90	0,09
8	20,19	0,90	0,04

Antes de realizar a leitura, todas as amostras passaram por uma centrifugação durante 5 minutos a 130 RPM, a fim de decantar qualquer partícula sólida em solução. Depois foram retiradas do eppendorf e colocadas na cubeta, onde passaram por uma degaseificação com o auxílio de uma bomba de vácuo também por 5 minutos. Após um tempo de espera de 15 minutos, as amostras foram então colocadas no equipamento para leitura do tamanho dos agregados, que é dado pelo raio hidrodinâmico.

5. RESULTADOS & DISCUSSÃO

5.1 Quantificação do peptídeo

Sabe-se que o peptídeo Hs02 possui apenas um triptofano (W) em toda sua cadeia polipeptídica. Desta forma, quantificando-se este resíduo de aminoácido é possível quantificar o peptídeo.

O valor de absorbância obtido foi de $A = 0,329$; utilizando a Equação 3 e depois multiplicando-se o valor encontrado pelo fator de diluição, achou-se a concentração do peptídeo. Sendo assim encontrou-se a concentração de peptídeo (já multiplicada pelo fator de diluição) de $2,991 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$.

5.2 Hs02 estrutura em α -hélice a partir de interação com o LPS

Como já relatado, o tratamento de macrófagos murinos com Hs02 inibe a ação pró-inflamatória do LPS.⁷ Para entender o mecanismo dessa inibição é necessário avaliar se ocorre interação entre o LPS e o Hs02. A partir do CD é possível determinar então se houve uma mudança na estrutura do peptídeo na presença da endotoxina.

Para avaliação dos dados de CD, foi necessário primeiro realizar uma transformação. Como os dados são exportados em elipticidade, o primeiro passo foi fazer a transformação para elipticidade molar residual a partir da Equação 1. Posteriormente, com os dados transformados, os valores obtidos para as amostras de Hs02 acrescidos de LPS foram subtraídos dos valores obtidos para o LPS puro para cada comprimento de onda e os gráficos plotados.

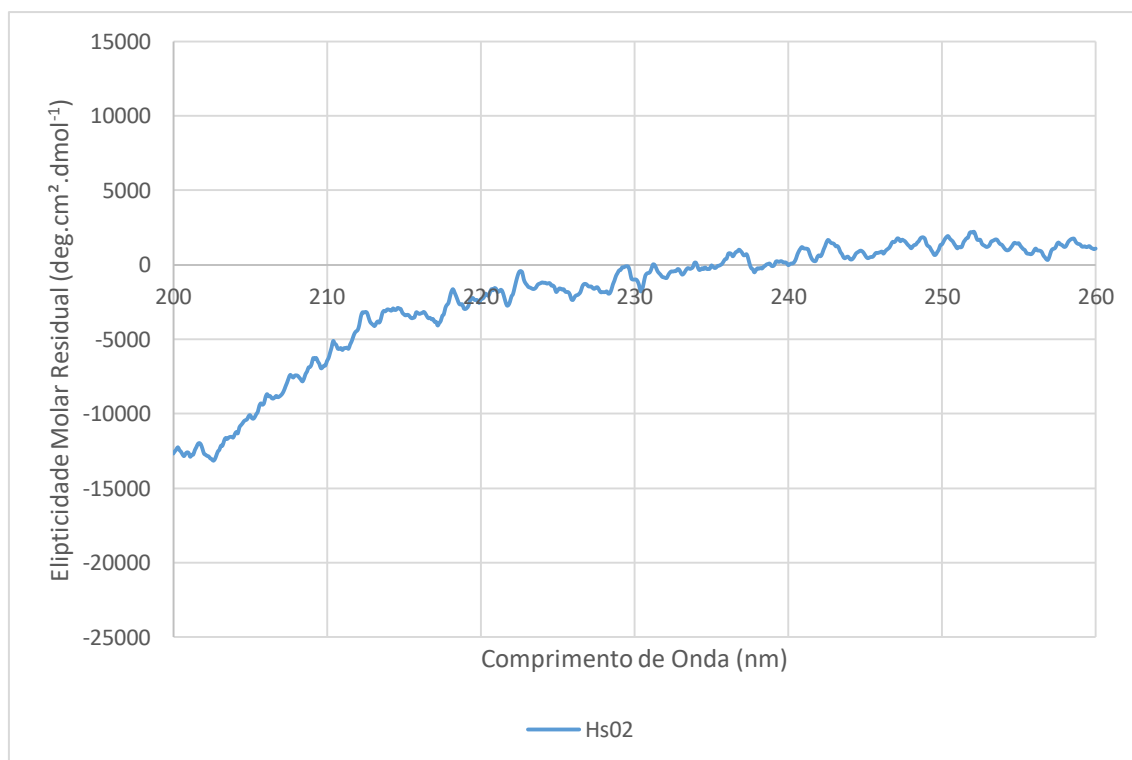


FIGURA 7 - Espectro da região de UV distante (260 a 200nm) para o peptídeo Hs02 puro a uma concentração de $20\mu\text{M}$ em tampão PBS.

Como é possível observar na Figura 7, o espectro obtido para o Hs02 puro demonstra um peptídeo sem estrutura definida na presença de tampão fosfato, conforme esperado. A medida em que foi se aumentando a concentração de LPS, nas razões de 0,089 e 0,178 mol/mol de LPS/Hs02, respectivamente, o peptídeo apresentou ligeira alteração em sua estrutura, como pode-se observar no gráfico exibido na Figura 8. Dando a entender que o peptídeo necessita de concentrações mais altas de LPS para apresentar alteração significativa em sua estrutura.

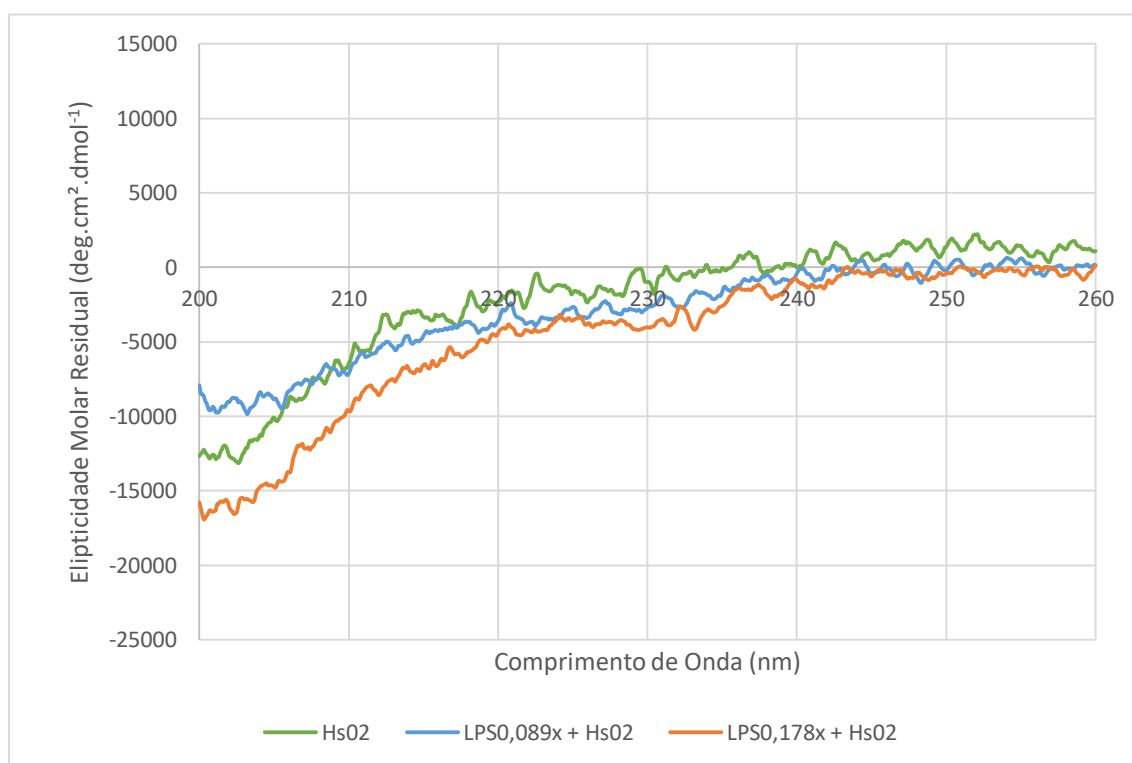


FIGURA 8 – Espectro da região UV distante (200 a 260 nm) para o peptídeo Hs02 puro (em verde) e amostras de Hs02 acrescidos de LPS nas razões de 0,089 e 0,178 mol/mol de LPS/Hs02.

Para as razões molares de 0,267; 0,356 e 0,445 mol/mol de LPS/Hs02, o Hs02 passou a exibir um comportamento similar com um peptídeo estruturado em α -hélice, demonstrando que o Hs02 apresenta estruturação decorrente da interação a partir da razão molar de 0,267. É possível observar tal comportamento na Figura 9.

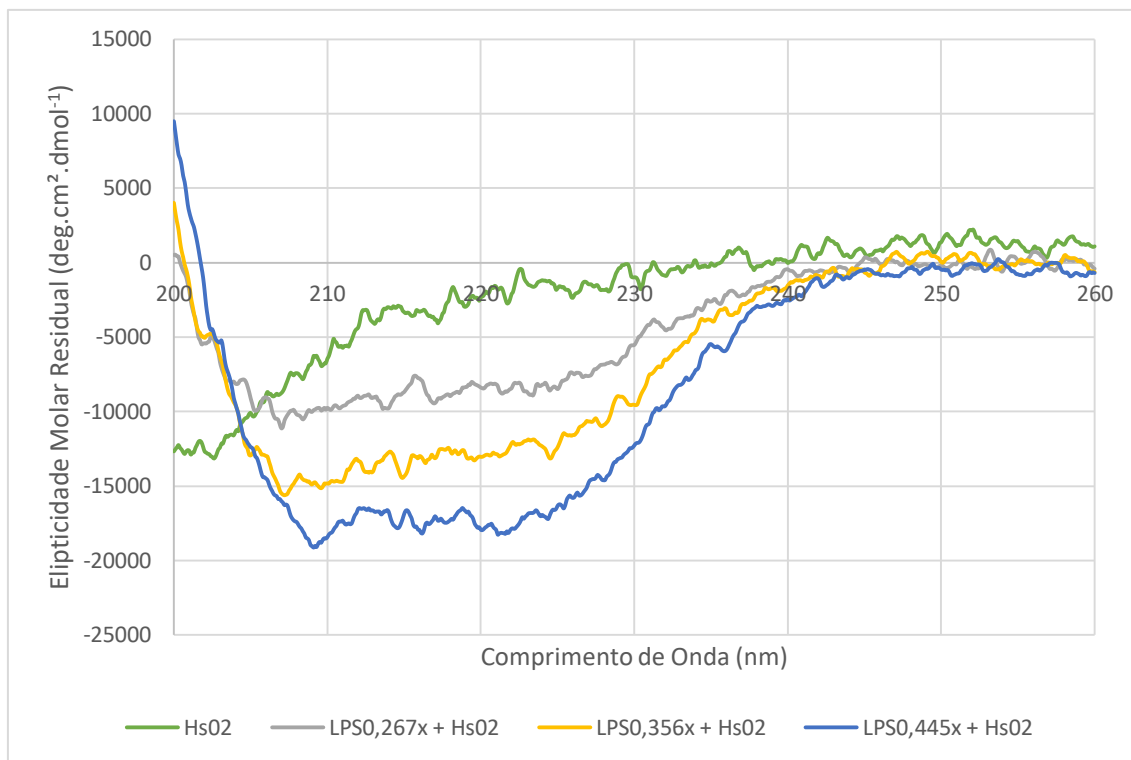


FIGURA 9 – Espectro da região UV distante (200 a 260 nm) para o peptídeo Hs02 puro (em verde) e amostras de Hs02 acrescidos de LPS nas razões de 0,267; 0,356 e 0,445 mol/mol de LPS/Hs02.

Para quantificar o que foi observado nos Figuras 7, 8 e 9 utilizou-se a Equação 2 para calcular a porcentagem de hélice relativa pelos valores de elipticidade molar residual no comprimento de onda de 222 nm, onde os dados estão apresentados na Tabela 3 abaixo.

Tabela 3 – Valores de porcentagem de hélice obtidos para cada relação mol/mol de LPS/Hs02.

Relação Molar LPS/Hs02	0	0,089	0,178	0,267	0,356	0,445
Porcentagem de Hélice	13,12%	17,27%	18,61%	29,33%	38,79%	53,48%

Plotando-se a Porcentagem de Hélice versus a Relação Molar LPS/Hs02 é possível notar uma tendência do comportamento do peptídeo. Conforme a Figura 10, nas razões molares mais baixas ele altera muito pouco sua estrutura e de um ponto para o outro já apresenta uma diferença significativa.

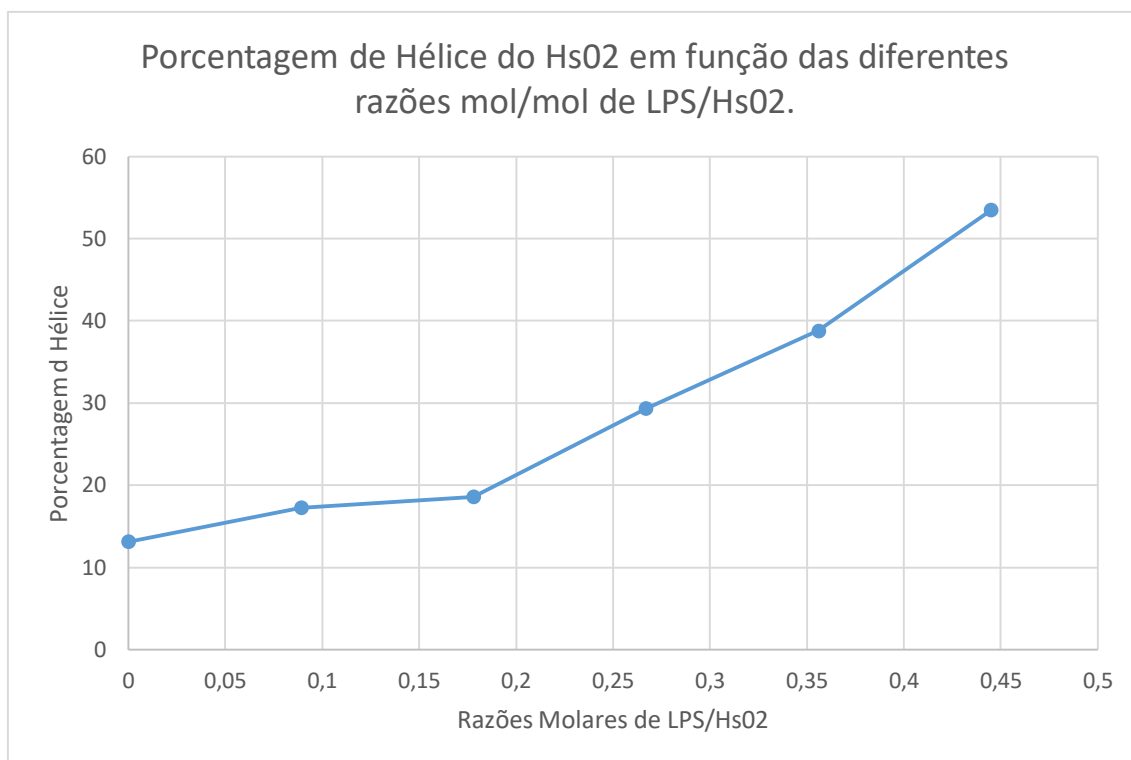


FIGURA 10 – Porcentagem de Hélice do Hs02 em função das diferentes razões mol/mol de LPS/Hs02.

A estruturação do peptídeo na presença do LPS ocorreu conforme o esperado, visto que existem estudos demonstrando o mesmo comportamento para outros AMPs.^{5,34,36} Assim, temos evidências de que a inibição da ação pró-inflamatória causada pelo LPS se dá mediante interação direta entre o Hs02 e a endotoxina.

Nenhum dos estudos acima citados foram muito precisos quanto aos resultados em função das razões mol/mol de LPS/Hs02 utilizados. Em Nan et al. (2012), por exemplo, a estruturação foi avaliada em amostras com concentração do peptídeo de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em 0,1% de LPS, o que configura uma quantidade bem pequena de endotoxina. Porém, dos doze peptídeos analisados, mais de 90% apresentaram porcentagem de hélice maior que 50% mesmo nessa proporção muito baixa.

5.3 Hs02 diminui o tamanho dos agregados de LPS em altas relações molares de LPS/Hs02

A análise feita por DLS tem como objetivo verificar o comportamento do LPS decorrente da interação com o peptídeo. Sabendo que os LPSs formam agregados supramoleculares de tamanho variável, foi avaliado se a presença do Hs02 influencia nesse comportamento da endotoxina, aumentando, diminuindo ou não alterando o tamanho dos seus agregados.

Começando então pela leitura do LPS de *E. coli* puro, foi revelada a presença de duas populações de agregados de LPS com diferentes raios hidrodinâmicos em tampão PBS. O agregado de menor tamanho apresentou um raio hidrodinâmico de $35,6 \pm 7,9 \text{ nm}$ e o de maior tamanho $181,5 \pm 15,0 \text{ nm}$. A adição de Hs02 na menor concentração avaliada, 18 vezes menor que a concentração de LPS, causou a

diminuição do raio hidrodinâmico do agregado de maior tamanho para $123,3 \pm 18,1$ nm, enquanto que o agregado de menor raio hidrodinâmico se manteve inalterado.

Para afirmar estatisticamente se os valores encontrados são diferentes, foi utilizado o teste estatístico de análise variância (ANOVA). O teste leva em consideração os valores utilizados para determinar o valor médio e a variância. Foi utilizado o próprio Excel para a realização do teste e o valor de F encontrado (18,45) foi maior do que o valor de F crítico (7,71). Sendo assim a hipótese nula é rejeitada, a qual dizia que as médias são iguais. Então é possível afirmar estatisticamente que houve uma diminuição do raio hidrodinâmico.

O aumento da concentração de Hs02 nas razões molares de 9 de LPS pra 1 de peptídeo e 4,5:1 também provocaram uma diminuição do agregado de maior tamanho, entretanto tiveram um aumento em relação à primeira adição de peptídeo. Sendo possível afirmar, inclusive, que, estatisticamente, na proporção de 4,5:1 o agregado manteve o mesmo tamanho de raio hidrodinâmico do LPS puro.

Na adição de peptídeo na proporção de 1:0,89 obteve-se um pequeno aumento do valor médio do raio hidrodinâmico com relação ao LPS puro, embora este não tenha sido estatisticamente significativo. Nas razões molares superiores, os valores se mantiveram praticamente os mesmos, com pequenas variações, sem significado estatístico. Porém, observando o comportamento do gráfico na Figura 11, é possível notar uma relação dose-resposta.

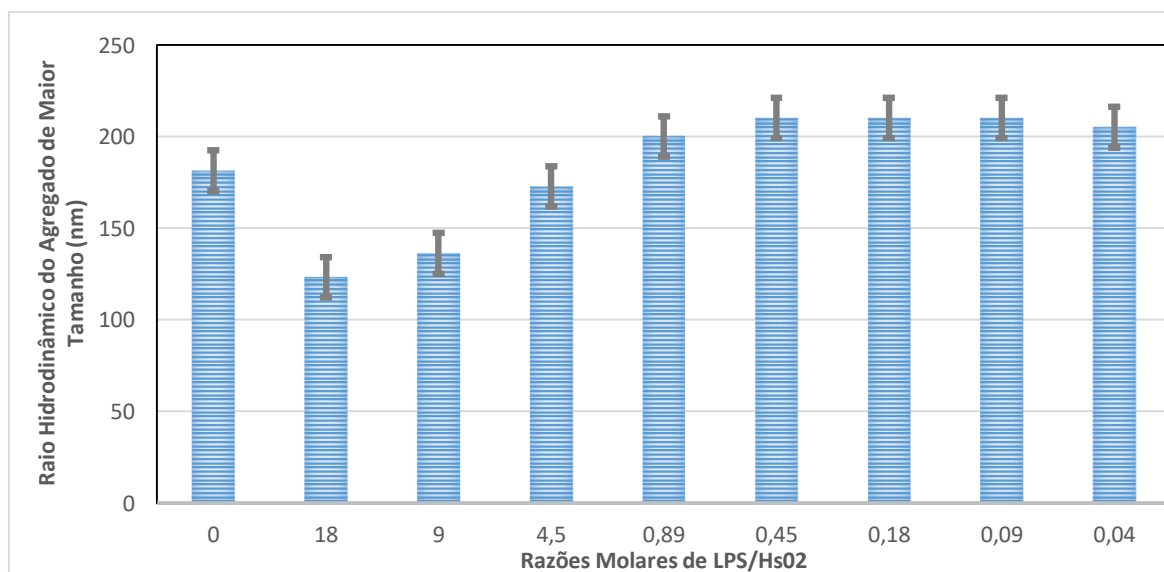


FIGURA 11 – Raio Hidrodinâmico do agregado de maior tamanho para cada razão mol/mol de LPS/Hs02.

Por meio do gráfico pode-se supor que a adição de Hs02 diminui o tamanho dos agregados de LPS mesmo em concentrações muito baixas de peptídeo. Além disso, podemos afirmar também que após determinada concentração o peptídeo não diminui mais o tamanho do agregado. Estatisticamente o raio hidrodinâmico do agregado de maior tamanho continua o mesmo.

O efeito do AMP nos agregados de LPS é bem variável. Por exemplo, Heinbockel et al. (2015) avaliou o comportamento dos agregados de LPS decorrente da interação de dois AMPs com a endotoxina. Os resultados obtidos foram bem distintos, onde um dos AMPs provocava a desagregação e consequente diminuição do raio hidrodinâmico e outro causava um aumento do tamanho dos agregados.⁴⁴

Em outro estudo, a análise do efeito da Polimixina B nos agregados de LPS mostrou uma dependência da concentração de LPS. Quando a endotoxina estava a $0,3 \text{ mg.mL}^{-1}$, a adição do AMP não provocou nenhuma alteração significativa no tamanho dos agregados. Já na concentração de 3 mg.mL^{-1} do LPS, entretanto, houve uma alteração no tamanho dos agregados decorrente da interação com a Polimixina B. Em altas concentrações do AMP foi constatado um aumento do raio hidrodinâmico dos agregados.⁴⁵

O Hs02 parece apresentar uma combinação dos resultados exibidos pelos estudos anteriormente citados. No atual trabalho utilizou-se uma concentração de $19,8 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ do LPS, uma concentração baixa, o que pode justificar o fato do raio hidrodinâmico dos agregados não ter alterado estatisticamente em concentrações elevadas do peptídeo, de acordo com o que foi visto em Domingues et al. (2012). Entretanto, não elimina o fato de que houve efeito proveniente da interação, uma vez que na menor proporção ocorreu mudança no tamanho do agregado. Ainda é possível dizer que em maiores concentrações do peptídeo ocorre uma adsorção dos AMPs nos agregados de LPS, formando um agregado misto, já que se constata um pequeno aumento no raio hidrodinâmico.

6. CONCLUSÕES & PERSPECTIVAS

Conforme esperado, os resultados mostram que ocorre interação entre LPS e Hs02 e os efeitos decorrentes dessa interação são os prováveis responsáveis pela inibição do processo inflamatório causado pela endotoxina. A estruturação do Hs02 na presença de LPSs e a alteração na agregação de moléculas de LPS na presença de Hs02 são fortes evidências disso.

Apesar da porcentagem de hélice apenas ter sofrido alteração significativa a partir da razão 0,267 mol/mol de LPS/Hs02, é evidente que há interação, pois, o valor de porcentagem de hélice vai de 13% para mais de 50% a medida que se adiciona LPS. Contudo, torna-se necessária a realização de experimentos em razões molares de LPS/Hs02 superiores as aqui apresentadas a fim de obter a máxima estruturação do IAP. Tais medidas tornam-se experimentalmente difíceis já que o LPS absorve na faixa do UV distante, o que pode dificultar a análise da estruturação no peptídeo Hs02.

Como já relatado anteriormente, é bastante complicado prever o comportamento dos AMPs e na sua interação com os LPSs não poderia ser diferente. É necessário aprofundar mais o estudo e submetê-lo a diferentes condições, porém nas condições aqui utilizadas o Hs02 se mostra como um caso particular comparado a outros estudos quando o assunto é alteração dos agregados de LPS. O peptídeo foi capaz de diminuir, aumentar e manter o tamanho dos agregados apenas alterando as razões entre LPS e peptídeo.

Visto que os dados da Espectroscopia de Dicroísmo Circular acusam interação entre as moléculas e os dados do Espalhamento Dinâmico de Luz acusam um aumento no tamanho dos agregados, pode-se inferir que a atividade anti-inflamatória do peptídeo Hs02 se dá por meio de uma interação com o LPS, que acaba por impedir a formação do complexo LPS-LBP, o iniciador dos processos pró-inflamatórios.

Esse resultado abre portas para, além de buscar entender melhor a interação LPS-Hs02, avaliar mais a fundo os mecanismos de inibição da atividade anti-inflamatória do Hs02. Verificando se ocorre interação entre Hs02 e LBP, por exemplo, ou buscando se ocorre a ativação de alguma via sinalizadora celular pela presença do peptídeo.

O caminho para a utilização dessas moléculas na prevenção de sepse ainda é longo, sendo necessário subordinar o peptídeo a mais variadas condições. Os primeiros passos, entretanto, estão sendo dados e é mais do que razoável afirmar que os resultados são promissores, colocando-as como alternativas com potencial.

7. BIBLIOGRAFIA

- [1] BRANDENBURG, Klaus. Lack of new antiinfective agents: Passing into the pre-antibiotic age? **World Journal Of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 6, n. 3, p.71-77, 2015. Baishideng Publishing Group Inc.. <http://dx.doi.org/10.4331/wjbc.v6.i3.71>. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4549771/>>. Acesso em: 20 nov. 2019.
- [2] LOBO, Suzana Margareth et al. Mortality due to sepsis in Brazil in a real scenario: the Brazilian ICUs project. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, [s.l.], v. 31, n. 1, p.1-4, 2019. GN1 Genesis Network. <http://dx.doi.org/10.5935/0103-507x.20190008>. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-507X2019000100001>. Acesso em: 20 nov. 2019.
- [3] INSTITUTO LATINO AMERICANO DE SEPSE (Org.). **O que é Sepsis**. 2018. Disponível em: <<https://ilas.org.br/o-que-e-sepsis.php>>. Acesso em: 20 nov. 2019.
- [4] SUN, Yue; SHANG, Dejing. Inhibitory Effects of Antimicrobial Peptides on Lipopolysaccharide-Induced Inflammation. **Mediators Of Inflammation**, [s.l.], v. 2015, p.1-8, 2015. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/167572>. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4647054/#B31>>. Acesso em: 15 nov. 2019.
- [5] NAN, Yong Hai et al. Prokaryotic selectivity and LPS-neutralizing activity of short antimicrobial peptides designed from the human antimicrobial peptide LL-37. **Peptides**, [s.l.], v. 35, n. 2, p.239-247, jun. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2012.04.004>. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0196978112001738>>. Acesso em: 17 nov. 2019.
- [6] LIMA, João Batista de Area et al. Síndrome de disfunção de múltiplos órgãos induzida por sepsis: estudo experimental em ratos. **Abcd. Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva (São Paulo)**, [s.l.], v. 24, n. 2, p.95-102, jun. 2011. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0102-67202011000200002>. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-67202011000200002>. Acesso em: 13 nov. 2019.
- [7] BRAND, Guilherme D. et al. Intragenic antimicrobial peptides (IAPs) from human proteins with potent antimicrobial and anti-inflammatory activity. **Plos One**, [s.l.], v. 14, n. 8, p.1-20, 6 ago. 2019. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0220656>. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0220656>>. Acesso em: 01 nov. 2019.
- [8] DUBOS, René J.. STUDIES ON A BACTERICIDAL AGENT EXTRACTED FROM A SOIL BACILLUS: I. PREPARATION OF THE

AGENT. ITS ACTIVITY IN VITRO. **Journal Of Experimental Medicine**. [s.l.], p. 1-10. jun. 1939. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2133784/>>. Acesso em: 10 nov. 2019.

[9] DUBOS, René J.. STUDIES ON A BACTERICIDAL AGENT EXTRACTED FROM A SOIL BACILLUS. **Journal Of Experimental Medicine**. [s.l.], p. 11-17. 1 jul. 1939. Disponível em: <<http://jem.rupress.org/content/70/1/11.long>>. Acesso em: 10 nov. 2019.

[10] ZHAO, Xiaowei et al. LAMP: A Database Linking Antimicrobial Peptides. **Plos One**, [s.l.], v. 8, n. 6, p.57-65, 18 jun. 2013. Public Library of Science (PLOS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0066557>. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0066557>>. Acesso em: 10 nov. 2019.

[11] CONLON, J. Michael. Antimicrobial Peptides in Frog Skin Secretions. **Methods In Molecular Biology**. Totowa, p. 3-14. dez. 2009. Disponível em: <https://link.springer.com/protocol/10.1007%2F978-1-60761-594-1_1#citeas>. Acesso em: 05 nov. 2019.

[12] LEIPPE, M. Antimicrobial and cytolytic polypeptides of amoeboid protozoa - effector molecules of primitive phagocytes. **Developmental & Comparative Immunology**. [s.l.], p. 267-279. jun. 1999. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0145305X99000105?via%3Dihub>>. Acesso em: 02 nov. 2019.

[13] ZASLOFF, Michael. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **Nature**, [s.l.], v. 415, n. 6870, p.389-395, jan. 2002. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/415389a>. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/415389a>>. Acesso em: 02 nov. 2019.

[14] BAHAR, Ali; REN, Dacheng. Antimicrobial Peptides. **Pharmaceuticals**, [s.l.], v. 6, n. 12, p.1543-1575, 28 nov. 2013. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ph6121543>. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1424-8247/6/12/1543>>. Acesso em: 02 nov. 2019.

[15] RCSB, Protein Data Bank (Org.). **1G89: STRUCTURE OF THE BOVINE ANTIMICROBIAL PEPTIDE INDOLICIDIN BOUND TO DODECYLPHOSPHOCHOLINE MICELLES**. 2000. Disponível em: <<https://www.rcsb.org/structure/1G89>>. Acesso em: 05 nov. 2019.

[16] RCSB, Protein Data Bank (Org.). **2MAG: NMR STRUCTURE OF MAGAININ 2 IN DPC MICELLES, 10 STRUCTURES**. 1997. Disponível em: <<https://www.rcsb.org/structure/2MAG>>. Acesso em: 02 nov. 2019.

[17] POWERS, Jon-paul S; HANCOCK, Robert E.w. The relationship between peptide structure and antibacterial activity. **Peptides**, [s.l.], v. 24, n. 11, p.1681-1691, nov. 2003. Elsevier BV.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2003.08.023>. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0196978103003425?via%3Dihub>>. Acesso em: 12 nov. 2019.

[18] MCMANUS, A.M. et al. THE THREE-DIMENSIONAL SOLUTION STRUCTURE OF THE RABBIT KIDNEY DEFENSIN, RK-1. **Biochemistry**, [s.l.], p.15757-15764, 2 maio 2001. Worldwide Protein Data Bank. <http://dx.doi.org/10.2210/pdb1ews/pdb>. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/bi000457l>>. Acesso em: 12 nov. 2019.

[19] UTENG, Marianne et al. Three-Dimensional Structure in Lipid Micelles of the Pediocin-like Antimicrobial Peptide Sakacin P and a Sakacin P Variant That Is Structurally Stabilized by an Inserted C-Terminal Disulfide Bridge†. **Biochemistry**, [s.l.], v. 42, n. 39, p.11417-11426, out. 2003. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/bi034572i>. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/bi034572i>>. Acesso em: 12 nov. 2019.

[20] HUANG, Yibing; HUANG, Jinfeng; CHEN, Yuxin. Alpha-helical cationic antimicrobial peptides: relationships of structure and function. **Protein & Cell**, [s.l.], v. 1, n. 2, p.143-152, fev. 2010. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s13238-010-0004-3>. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs13238-010-0004-3>>. Acesso em: 02 nov. 2019.

[21] TOSSI, Alessandro; SANDRI, Luca; GIANCASPERO, Anna. Amphipathic, α -helical antimicrobial peptides. **Biopolymers**, [s.l.], v. 55, n. 1, p.4-30, 2000. Wiley. [http://dx.doi.org/10.1002/1097-0282\(2000\)55:13.0.co;2-m](http://dx.doi.org/10.1002/1097-0282(2000)55:13.0.co;2-m). Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/1097-0282%282000%2955%3A1%3C4%3A%3AAID-BIP30%3E3.0.CO%3B2-M>>. Acesso em: 03 nov. 2019.

[22] DENNISON, Sarah et al. Amphiphilic α -Helical Antimicrobial Peptides and Their Structure / Function Relationships. **Protein & Peptide Letters**, [s.l.], v. 12, n. 1, p.31-39, 1 jan. 2005. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/0929866053406084>. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/8092137_Amphiphilic_a-Helical_Antimicrobial_Peptides_and_Their_Structure_Function_Relationships>. Acesso em: 03 nov. 2019.

[23] BESSALLE, R et al. Augmentation of the antibacterial activity of magainin by positive-charge chain extension. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, [s.l.], v. 36, n. 2, p.313-317, 1 fev. 1992. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aac.36.2.313>. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/21549330_Augmentation_of_the_antibacterial_activity_of_magainin_by_positive-charge_chain_extension>. Acesso em: 03 nov. 2019.

[24] WADE, John D. et al. Chemical synthesis and biological evaluation of an antimicrobial peptide gonococcal growth inhibitor. **Amino Acids**, [s.l.], v. 43, n. 6, p.2279-2283, 4 maio 2012. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00726-012-1305-z>. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/224896941_Chemical_synthesis_and_biological_evaluation_of_an_antimicrobial_peptide_gonococcal_growth_inhibitor>. Acesso em: 12 nov. 2019.

[25] MADIGAN, Michael. **The Biology of Microorganisms**. [s.l.]: Prentice Hall, 2003.

[26] LIMA, João Batista de Area et al. Síndrome de disfunção de múltiplos órgãos induzida por sepse: estudo experimental em ratos. **Abcd. Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva (São Paulo)**, [s.l.], v. 24, n. 2, p.95-102, jun. 2011. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0102-67202011000200002>. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-67202011000200002>. Acesso em: 13 nov. 2019.

[27] ERRIDGE, Clett; BENNETT-GUERRERO, Elliott; POXTON, Ian R.. Structure and function of lipopolysaccharides. **Microbes And Infection**, [s.l.], v. 4, n. 8, p.837-851, jul. 2002. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1286-4579\(02\)01604-0](http://dx.doi.org/10.1016/s1286-4579(02)01604-0). Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1286457902016040?via%3Dihub>>. Acesso em: 08 nov. 2019.

[28] DING, Lai et al. Interaction of Antimicrobial Peptides with Lipopolysaccharides. **Biochemistry**, [s.l.], v. 42, n. 42, p.12251-12259, out. 2003. Disponível em: <[#>](https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/bi035130+)>. Acesso em: 12 nov. 2019.

[29] FREUDENBERG, Marina A. et al. Lipopolysaccharide sensing an important factor in the innate immune response to Gram-negative bacterial infections: Benefits and hazards of LPS hypersensitivity. **Immunobiology**, [s.l.], v. 213, n. 3-4, p.193-203, maio 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.imbio.2007.11.008>. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0171298507001465>>. Acesso em: 13 nov. 2019.

[30] GIULIANI, Andrea; PIRRI, Giovanna; RINALDI, Andrea C.. Antimicrobial Peptides: The LPS Connection. **Methods In Molecular Biology**, [s.l.], p.137-154, 28 set. 2009. Humana Press. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-60761-594-1_10. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/41112936_Antimicrobial_Peptides_The_LPS_Connection>. Acesso em: 13 nov. 2019.

[31] BROWN, Kelly L; HANCOCK, Robert Ew. Cationic host defense (antimicrobial) peptides. **Current Opinion In Immunology**, [s.l.], v. 18, n. 1, p.24-30, fev. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.coi.2005.11.004>. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0952791505001998>>. Acesso em: 13 nov. 2019.

[32] BRANDENBURG, Klaus et al. Peptides with dual mode of action: Killing bacteria and preventing endotoxin-induced sepsis. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Biomembranes**, [s.l.], v. 1858, n. 5, p.971-979, maio 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2016.01.011>. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0005273616300013>>. Acesso em: 18 nov. 2019.

[33] LI, Peng et al. Perturbation of Lipopolysaccharide (LPS) Micelles by Sushi 3 (S3) Antimicrobial Peptide. **Journal Of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 279, n. 48, p.50150-50156, 24 ago. 2004. American Society for Biochemistry & Molecular Biology (ASBMB). <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m405606200>. Disponível em: <<http://www.jbc.org/content/279/48/50150.long>>. Acesso em: 13 nov. 2019.

[34] RYDER, Matthew P. et al. Binding interactions of bacterial lipopolysaccharide and the cationic amphiphilic peptides polymyxin B and WLBU2. **Colloids And Surfaces B: Biointerfaces**, [s.l.], v. 120, p.81-87, ago. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.05.004>. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927776514002306?via%3Dihub>>. Acesso em: 17 nov. 2019.

[35] CORREA, Daniel H. A.. The use of circular dichroism spectroscopy to study protein folding, form and function. **African Journal Of Biochemistry Research**. [s.l.], p. 164-173. maio 2009. Disponível em: <<https://academicjournals.org/journal/AJBR/article-abstract/15798EB10962>>. Acesso em: 07 nov. 2019.

[36] AVITABILE, Concetta; D'ANDREA, Luca Domenico; ROMANELLI, Alessandra. Circular Dichroism studies on the interactions of antimicrobial peptides with bacterial cells. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 4, n. 1, p.1-7, 12 mar. 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/srep04293>. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/srep04293>>. Acesso em: 14 nov. 2019.

[37] KELLY, Sharon. Circular Dichroism to Study Protein Interactions. **Current Protocols: in Protein Science**, [s.l.], v. 46, n. 1, p.1-18, nov. 2006. Disponível em: <<https://currentprotocols.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/0471140864.ps2010s46>>. Acesso em: 09 nov. 2019.

[38] INTEGRATED STRUCTURAL BIOLOGY GRENOBLE (Org.). **Presentation CD**. 2016. Disponível em: <<http://www.isbg.fr/biophysics-characterisation/circular-dichroism/?lang=fr>>. Acesso em: 10 nov. 2019.

[39] GOLDBURG, W. I.. Dynamic light scattering. **American Journal Of Physics**, [s.l.], v. 67, n. 12, p.1152-1160, dez. 1999. American Association of Physics Teachers (AAPT). <http://dx.doi.org/10.1119/1.19101>. Disponível em: <<https://aapt.scitation.org/doi/10.1119/1.19101>>. Acesso em: 12 nov. 2019.

[40] BERGSTRAND, Anna et al. Aggregation behavior and size of lipopolysaccharide from Escherichia coli O55: B5. **Colloids And Surfaces B: Biointerfaces**, [s.l.], v. 53, n. 1, p.9-14, nov. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2006.06.007>. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927776506002062?via%3Dihub>>. Acesso em: 18 nov. 2019.

[41] LEE, Che-hung; TSAI, Chao-ming. Quantification of Bacterial Lipopolysaccharides by the Purpald Assay: Measuring Formaldehyde Generated from 2-keto-3-deoxyoctonate and Heptose at the Inner Core by Periodate Oxidation. **Analytical Biochemistry**, [s.l.], v. 267, n. 1, p.161-168, fev. 1999. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1006/abio.1998.2961>. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000326979892961X?via%3Dihub>>. Acesso em: 18 nov. 2019.

[42] GROVES, William E.; DAVIS, Francis C.; SELLS, Bruce H.. Spectrophotometric determination of microgram quantities of protein without nucleic acid interference. **Analytical Biochemistry**, [s.l.], v. 22, n. 2, p.195-210, fev. 1968. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(68\)90307-2](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(68)90307-2). Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0003269768903072>>. Acesso em: 20 nov. 2019.

[43] PACE, Nick et al. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. **Protein Science**, [s.l.], v. 4, n. 11, p.2411-2423, nov. 1995. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/pro.5560041120>>. Acesso em: 20 nov. 2019.

[44] HEINBOCKEL, Lena et al. Mechanism of Hby-35-induced an increase in the activation of the human immune system by endotoxins. **Innate Immunity**, [s.l.], v. 21, n. 3, p.305-313, 16 jul. 2014. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1177/1753425914535957>. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/1753425914535957?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%3dpubmed>. Acesso em: 18 nov. 2019.

[45] DOMINGUES, Marco M. et al. Biophysical characterization of polymyxin b interaction with LPS aggregates and membrane model systems. **Biopolymers**, [s.l.], v. 98, n. 4, p.338-344, 2012. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/bip.22095>. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/bip.22095>>. Acesso em: 18 nov. 2019.